



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**INGRID BORGES SIQUEIRA**

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Croton tetradenius* (Baill.) FRENTE A BACTÉRIAS  
UROPATÓGENAS E SINERGISMO COM ANTIBIÓTICOS**

São Cristóvão/SE  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**INGRID BORGES SIQUEIRA**

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Croton tetradenius* (Baill.) FRENTE A BACTÉRIAS  
UROPATÓGENAS E SINERGISMO COM ANTIBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Andrea T. Barbosa

Linha de pesquisa: Química e Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos

São Cristóvão/SE  
Julho/2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S618p Siqueira, Ingrid Borges  
Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Croton tetradenius* (Baill.) frente a bactérias uropatógenas e sinergismo com antibióticos / Ingrid Borges Siqueira ; orientador Silvio Santana Dolabella. – São Cristóvão, 2018.

40 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Trato urinário - Infecções.  
3. Bacterioses.. 4. Antibióticos. I. Dolabella, Silvio Santana, orient.  
II. Título.


CDU 615.322:616.6

**INGRID BORGES SIQUEIRA**

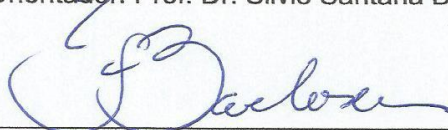
**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Croton tetradenius* (Baill.) FRENTE A BACTÉRIAS  
UROPATÓGENAS E SINERGISMO COM ANTIBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal de Sergipe como  
requisito à obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

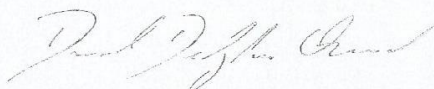
Aprovada em: 31 / 07 / 2017



Orientador: Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella



1º Examinador: Prof. Dr. Flávio Henrique Ferreira Barbosa



2º Examinador: Prof. Dr. Daniel Delgado Queissada

PARECER

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

## RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU's) estão entre as doenças mais frequentes no ser humano, sendo mais comuns em mulheres e podendo apresentar-se como assintomáticas ou sintomáticas. O principal agente etiológico das ITU's é a bactéria *Escherichia coli* (aproximadamente 90% dos casos); porém, outras bactérias Gram-negativo e algumas Gram-positivo podem estar envolvidas no processo infeccioso. Diante do cenário atual do desenvolvimento de linhagens resistentes a antibióticos, o estudo de métodos alternativos para o controle de doenças infecciosas tem sido objeto de vários grupos de pesquisa. Portanto, este trabalho teve como objetivo testar dois diferentes genótipos do óleo essencial de *Croton tetradenius* frente à linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Inicialmente, o espectro de atividade dos óleos foi testado pelo método de difusão em ágar. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Dose Bactericida Mínima (DBM) dos óleos frente às cepas selecionadas, seguido de teste para determinação da curva de crescimento dos microrganismos. Utilizou-se o Método de Checkboard para avaliar o sinergismo entre os óleos essenciais e os antibióticos ciprofloxacino e meropenem frente às bactérias utilizadas. A citotoxicidade dos óleos essenciais foi verificada através do método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) frente a fibroblastos L929. Observou-se que os genótipos de *C. tetradenius* apresentaram atividade contra os microrganismos testados com formação de halos de inibição superiores a 9,0mm e o único microrganismo que não foi inibido por nenhum dos genótipos foi *P. aeruginosa*. A CMI para os microrganismos testados variou de 1,4 a 11,3mg/mL, enquanto a DBM variou entre 2,8mg/mL a 11,3mg/mL. O aumento da concentração do óleo essencial no meio de cultura resultou no aumento da fase lag e diminuição da taxa de crescimento e DO máxima atingida pelas culturas. O OE em combinação entre os antibióticos apresentaram um efeito sinérgico na maioria das combinações, sendo indiferente somente frente à *E.coli* quando combinado o OE e ciprofloxacino. Os óleos testados não apresentaram citotoxicidade significativa nas concentrações de 50 e 100 ug/mL.

**Palavras-chave:** potencial antibacteriano, óleo essencial, uropatógenos, *Croton tetradenius*.

## ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are the most common infections experienced by humans. It is mainly found in the female gender and it is generally associated with symptomatic and asymptomatic bacteriuria. The most common etiological agent of UTIs is *Escherichia coli* (approximately 90% of cases); However, other Gram-negative and some Gram-positive bacteria may be involved in the infectious process. Facing the current scenario of antibiotic resistant strains selection, the study of alternative methods for the control of infectious diseases has been the object of several research groups. Therefore, the purpose of this work was to test different genotypes of *Croton tetradenius* essential oil (EO) against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Initially, the spectrum of the oils activity against these microorganisms was tested by the agar diffusion method. In order to evaluate the antimicrobial activity, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Dose (MBD) of the oils against the selected strains were determined followed by a test to determine the microorganisms growth curve. The *Checkboard* Method was used to evaluate the synergism between the essential oils and the antibiotics ciprofloxacin and meropenem against the bacteria used. The cytotoxicity of the essential oils was verified by the MTT method (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide), against mouse fibroblast lineage L929. Then it was observed that *C. tetradenius* genotypes showed activity against the tested microorganisms. In addition, the inhibition halos found higher than 9 mm and the only microorganism that was not inhibited by any of the genotypes was *P. aeruginosa*. Also the MIC for the microorganisms tested ranged from 1.4 to 11.3 mg / mL, while the MBD varied from 2.8 mg / mL to 11.3 mg / mL. By increasing the concentration of essential oil in the culture medium the lag phase raised while the growth rate decreased as well as the maximal DO reached by cultures. Essential oils in combination with antibiotics showed a synergistic effect in most combinations, being indifferent only to *E.coli* when combined with EO and ciprofloxacin. The tested oils had no cytotoxicity at concentrations of 50 and 100 ug / mL.

**Keywords:** antibacterial potencial, essential oil, uropathogens, *Croton tetradenius*.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	i
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS .....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1. Infecções do Trato Urinário (ITU's).....	12
2.2. Plantas Medicinais com Atividade Antibacteriana .....	13
2.2.1. Plantas do gênero <i>Croton</i> .....	14
2.2.1.1. <i>Croton tetradenius</i> Baill.....	15
2.3. Óleos Essenciais .....	15
3. REFERÊNCIAS .....	17
4. OBJETIVOS .....	22
4.1. GERAL .....	22
4.2. ESPECÍFICOS .....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1. Artigo .....	23
6. CONCLUSÕES.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspecto botânico de <i>Croton tetradenius</i> Baill.	14
---	----



## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BHI - Brain Heart Infusion

CG – Cromatógrafo Gasoso

CIF - Concentração Inibitória Fracionada

CIP – Ciprofloxacino

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

*C. tetradenius* – *Croton tetradenius*

CTE – *Croton tetradenius*

DBM – Dose Bactericida Mínima

DMEM - Meio Eagle Modificado

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade óptica

*E. coli* – *Escherichia coli*

EM- Espectômetro de massas

ICIF - Índice de Concentração Inibitória Fracionada

ITU – Infecção do Trato Urinário

OE – Óleos essenciais

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

MEM – Meropenem

MH – Muller Hinton

MTT – (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é um quadro infeccioso que acomete qualquer parte do sistema urinário, como rins, bexiga, uretra e ureteres, sendo mais comum na parte inferior do trato urinário, do qual fazem parte a bexiga e a uretra (1). A instalação e o desenvolvimento da infecção ocorrem através da capacidade de virulência do microrganismo invasor e de falhas na defesa do sistema imunológico do hospedeiro, com a aderência de bactérias patogênicas na mucosa, sua multiplicação e posterior colonização do trato urinário (2).

É considerada a segunda doença infecciosa mais comum na população, ocorrendo em ambos os sexos e em todas as idades, com maior predominância em mulheres adultas (3). A ITU pode ter como causa diferentes microrganismos, sendo o mais comum a *Escherichia coli*, seguido por infecções mistas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter aerogenes* (4).

O aumento da resistência dos microrganismos causadores de ITU aos antibióticos atuais e os efeitos nocivos associados a estes medicamentos têm motivado novas pesquisas a partir de produtos naturais (5,6). O uso de produtos derivados de plantas como os óleos essenciais, tem sido apontado como promissor para o tratamento de diversas doenças infecciosas (2,7).

Dentre as plantas com potencial terapêutico, o gênero *Croton* (Euphorbiaceae) possui mais de 1200 espécies e apresenta distribuição pantropical. O Brasil, apesar de congregar aproximadamente 350 espécies distribuídas em diversos ambientes como o cerrado, a caatinga e os campos rupestres (8,9) ainda possui poucos estudos relacionados ao gênero. *C. tetradenius* (Baill.) tem folhas delicadas e aroma bem acentuado mentolado, conhecido como “caatinga-de-bode”, “zabelê”, “velandinho”, “barba-de-bode”, endêmico na Caatinga e encontrado com frequência na maioria dos estados da região nordeste do Brasil (10).

Plantas do gênero *Croton* são utilizadas como remédios tradicionais para tratar dor de estômago, abscessos, malária, inflamações e infecções diversas (11).

Grande parte da população mundial apresenta confiança nos métodos tradicionais relativos aos cuidados diários com a saúde: aproximadamente 80% confia nos derivados de plantas medicinais para cuidados com a saúde e cerca de 25% das prescrições médicas são produtos derivados de plantas (13). Desta forma, pesquisadores têm se dedicado ao estudo de medicamentos de origem vegetal que sejam seguros, baratos e facilmente disponíveis (14,15).

Considerando o potencial terapêutico do óleo essencial de *Croton tetradenius*, estudos para explorar seu espectro de atividade, mecanismo de ação e citotoxicidade são imprescindíveis para sua aprovação comercial.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Infecções do Trato Urinário (ITU's)

As Infecções do Trato Urinário (ITU's) são as infecções bacterianas mais comuns no ser humano, consideradas um grande problema de saúde mundial com aproximadamente 150 milhões de casos anuais (16). Apesar de ocorrer em qualquer idade, apresentam maior prevalência em crianças com até seis anos de idade, mulheres jovens com vida sexual ativa e idosos (17).

Estão entre as infecções mais frequentes na comunidade e representa a principal causa de infecção nosocomial. Além disso, são as principais causadoras de bacteremia em pacientes internados, sobretudo, se tratando de diabetes mellitus e do uso de cateter vesical (18).

Contudo, as ITU's são mais comuns em mulheres, que apresentam 50 vezes mais chances de infecção que os homens, sendo que até 30% das mulheres apresentarão recidivas ao longo de sua vida (19). A principal via de infecção do trato urinário é a ascendente, onde microrganismos da microbiota comensal do trato gastrointestinal atinge o trato urinário a partir da uretra, podendo alcançar a bexiga e, por vezes, os rins (20,21). Em mulheres, atribui-se a menor extensão anatômica da uretra e a proximidade entre a vagina e o ânus como fatores pré-disponentes à infecção(19).

As ITU's podem ser complicadas ou simples, dependendo da localização do microrganismo. Considera-se não complicada quando os agentes patogênicos se localizarem na bexiga; já ao se instalarem no ureter e rins, será considerada complicada (22).

As ITU's são comumente ocasionadas por bactérias Gram-negativo da família Enterobacteriaceae, com aproximadamente 90% dos casos causados por *Escherichia coli* (22,23). Esta bactéria possui vários determinantes de virulência necessários à adesão inicial, colonização das superfícies mucosas do hospedeiro e invasão de células e tecidos, superando os mecanismos de defesa do hospedeiro e causando infecções persistentes e crônicas (24). Outros microrganismos Gram-negativo também como *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. e, esporadicamente, *Pseudomonas* sp. também podem ser responsáveis pela infecção (25).

De acordo com Adeep (16), a resistência antimicrobiana é um problema crescente e uma grande preocupação em muitos países. Isso faz com que a busca por novos agentes antimicrobianos seja uma importante estratégia para o estabelecimento de terapias alternativas (26). Em virtude de complicações que dificultam o tratamento antimicrobiano, opções de uso

de plantas medicinais demonstram importância para manutenção da saúde. Desta forma, diversos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com potencial terapêutico (27).

As ITU's estão entre as doenças infecciosas mais frequentemente diagnosticadas e que podem resultar em mortalidade. No Brasil, um total de 80% das consultas em clínicas de urologia feminina deve-se a esse tipo de infecção (28). Representam infecções frequentes tanto em pacientes da comunidade como em pacientes hospitalizados, caracterizando a causa mais comum de infecção nosocomial adquirida (19,29).

As ITU's acometem todas as idades, desde neonato até idosos. Sua maior incidência aumenta em mulheres sexualmente ativas, durante a gestação e menopausa (30). Em homens, a maior ocorrência se dá acima de 50 anos (19). Estudos de Zimmermann (31) demonstram uma maior prevalência de ITU's no sexo feminino, confirmando os achados literários.

Durante a gravidez, as ITU's são comuns devido a alterações hormonais e anatomo-fisiológicas facilitando o crescimento e disseminação bacteriana. Estima-se que 5 a 10% das gestantes desenvolvam algum tipo de ITU com consequências potencialmente graves à saúde materna e fetal caso não sejam devidamente tratadas (32).

## **2.2. Plantas Medicinais com Atividade Antibacteriana**

A população humana sempre teve estreita relação com os vegetais, seja para consumo alimentar ou como fonte de princípios ativos para o tratamento de muitas enfermidades (33). Na década de 1970, a Organização Mundial de Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa, onde produtos obtidos de recursos naturais são fontes milenares de tratamento de diversas infecções e doenças crônicas. Um levantamento realizado entre 1981 e 2002 pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry* demonstrou que, dentre 90 novas substâncias com potencial farmacológico analisado, 61 delas eram derivados semissintéticos de plantas e/ou oriundas de produtos naturais (34,35).

Produtos de origem vegetal são comumente empregados no Brasil para fins terapêuticos. Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais representa geralmente o único recurso terapêutico, tanto em regiões mais pobres quanto nas grandes cidades, devido ao fácil acesso da população a estes produtos, presentes em

comércio de feiras livres, mercados populares ou mesmo plantados em quintais residenciais (36).

É cada vez maior o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica à diversas doenças, o que requer dos pesquisadores e estudiosos um maior empenho para fornecer informações relativas ao sistema produtivo das plantas e preparo dos medicamentos, pois nem sempre as normas que garantem a qualidade dos fitoterápicos são cumpridas (37).

Em todo o mundo, o uso de plantas medicinais contribuiu significativamente para os cuidados primários de saúde. No Brasil, assim como em outros países da América Latina, a fitoterapia é uma alternativa econômica aos tratamentos usuais. Além disso, representa parte importante da cultura do povo, sendo também parte de um saber difundido entre populações ao longo de várias gerações (27). As plantas utilizadas pela medicina popular para o controle de infecções podem representar uma nova fonte de compostos antimicrobianos (38).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, com mais de 45.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta) catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (39,40).

Dentro desta perspectiva, o uso de plantas medicinais aliado ao tratamento convencional das diversas enfermidades bacterianas tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo que os óleos essenciais extraídos de plantas e/ou os seus princípios ativos podem ser utilizados como forma alternativa de quimioterapia nestas morbidades (41–44).

Estudos realizados por Al-Hussaini (45) demonstram grande potencial no uso de fitoterápicos, inclusive da atividade antimicrobiana dos extratos de plantas, muito embora sua funcionalidade ainda não esteja bem compreendida.

A pesquisa da atividade antimicrobiana de plantas medicinais no Brasil vem ganhando espaço e merecendo destaque nos últimos anos, como demonstrado nos trabalhos de Costa (26) e Toledo (46), que pesquisaram a ação antimicrobiana de plantas usadas na medicina popular sobre microrganismos distintos, dentre eles *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e leveduras do gênero *Cândida* sp. Ambos os trabalhos, demonstraram que as espécies de plantas estudadas foram eficazes contra os microrganismos testados, em especial frente às cepas de *Candida* sp.

### **2.2.1. Plantas do gênero *Croton***

O gênero *Croton*, pertencente à família Euphorbiaceae, é amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais pelo mundo, incluindo o Brasil, onde há 316 espécies

descritas (47). Espécies deste gênero são frequentemente utilizadas na medicina popular para alívio de dores, tratamento de cânceres, distúrbios relacionados ao trato gastrointestinal, inflamação, como antibiótico, entre outras (48).

#### 2.2.1.1. *Croton tetradenius* Baill

Espécie endêmica da região Nordeste do Brasil, encontrado na vegetação da caatinga nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (49). Disseminado em solo arenoso e pedregoso, em ambiente úmido e sombreado (10).

A planta tem sido alvo de estudos, por apresentar potencial inseticida sobre larvas do *A. aegypti*, tornando-se uma alternativa promissora para utilização no controle do vetor transmissor de arboviroses (12). Formulações desenvolvidas a partir do óleo essencial de *C. tetradenius* como potencial biológico foi relatado pela primeira vez usando o depósito de uma patente (49).



**Figura 1:** Aspecto botânico de *Croton tetradenius* Baill.

FONTE: <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumo-ins20169-id6191.pdf>

### 2.3. Óleos Essenciais

Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, obtidas de várias partes de plantas aromáticas. Sua principal característica é a volatilidade. São feitos a partir de uma mistura complexa de compostos, que é formado principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados (50,51).

Apresentam propriedades farmacêuticas por sua capacidade de gerar sabor e aromas, sendo de grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e coadjuvante em

medicamentos (52,53). Amplamente utilizada na medicina popular, os OEs apresentam-se promissores na terapêutica de doenças infecciosas, bem como em atividades antissépticas e anti-inflamatória (54).

Presentes em vários órgãos vegetais estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo funções importantes à sua sobrevivência, como por exemplo, na defesa contra microrganismos (55). Os OEs são extraídos das plantas através da destilação a vapor, obtendo-se misturas complexas que contém um a três componentes principais em concentrações razoavelmente altas (56).

Nos últimos anos, foi confirmado que os óleos essenciais (OEs) exercem atividade antimicrobiana, uma vez que são capazes de inibir o crescimento celular e inativar as células microbianas (57). Aouadi (58) demonstrou em seus estudos ação antifúngica do OE de *Ruta chalepensis* contra microrganismos de importância clínica e, recentemente Geraci (59), investigou a atividade antibacteriana de *Citrus sinensis* contra três microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens* e *Pseudomonas aeruginosa*.



### 3. REFERÊNCIAS

1. Schenkel DF, Dallé J, Antonello VS. Prevalência de uropatógenos e sensibilidade antimicrobiana em uroculturas de gestantes do Sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol e Obs.* 2014;36(3):102–6.
2. Carraro-Eduardo JC, Gava IA. O uso de vacinas na profilaxia das infecções do trato urinário. *J Bras Nefrol.* 2012;34(2):178–83.
3. Vogel NW, Taschetto, APD, Dall'Agnol R, Weidlich L, Ethur EM. Assessment of the antimicrobial effect of three plants used for therapy of community-acquired urinary tract infection in Rio Grande do Sul (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* 2011; 137(3):1334-1336.
4. Rafsanjany N, Sendker J, Lechtenberg M, Petereit F, Scharf B HA. Traditionally used medicinal plants against uncomplicated urinary tract infections: Are unusual, flavan-4-ol- and derhamnosylmaysin. *Fitoterapia.* 2015; 105: 246-253.
5. Oliveira, Anna Laiza Davila; Soares, Marcela Mendes; Santos, Thayzyna Cristina Duarte; Dos Santos A. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. *Rev Uningá.* 2014;20(3):65–71.
6. Sienkiewicz M, Łysakowska M, Kowalczyk E, Zyna G\_, Nska S, Kochan E, et al. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *J Burn.* 2016.
7. Lahmar A, Bedoui A, Mokdad-Bzeouich I, Dhaouifi Z, Kalboussi Z, Cheraif I, et al. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microb Pathog.* 2016;1–10.
8. Vitarelli NC, Riina R, Cassino MF, Strozi RM, Meira A. Trichome-like emergences in *Croton* of Brazilian highland rock outcrops: Evidences for atmospheric water uptake. *Perspect Plant Ecol Evol Syst.* 2016;22:23–35.
9. Silva JS, De Sales MF, Gomes APde S, Carneiro-Torres DS. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta bot bras.* 2010;24(2):441–53.
10. Lucena MFDA. Diversidade de Euphorbiaceae s.l. no nordeste do Brasil. (Tese Doutorado) Recife Universidade Fed Pernambuco. 2009;1–197.
11. Yang L, Zhang Y-B, Chen L-F, Chen N-H, Wu Z-N, Jiang S-Q, et al. New labdane diterpenoids from *Croton laui* and their anti-inflammatory activities. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016
12. Carvalho K da S, Da Cruz RCD, Silva SL da C, Gualberto SA. Atividade larvicida dos extratos. *Encicl Biosf.* 2015;11(21):2815–23.

13. Firmo WDCA, Menezes VAM De, Passos CEDC, Dias CN, Alves LPL, Dias ICL, et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad Pesq.* 2011;18(n. especial):90–95.
14. Bahmani M, Saki K, Shahsavari S, Rafieian-Kopaei M, Sepahvand R, Adineh A. Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(10):858–864.
15. Nergard CS, Ho TPT, Diallo D, Ballo N, Paulsen BS, Nordeng H. Attitudes and use of medicinal plants during pregnancy among women at health care centers in three regions of Mali, West-Africa. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2015;11(1):73.
16. Adeep M, Nima T, Kezang W, Tshokey T. A retrospective analysis of the etiologic agents and antibiotic susceptibility pattern of uropathogens isolated in the Jigme Dorji Wangchuck National Referral Hospital, Thimphu, Bhutan. *BMC Res Notes.* 2016;9(1):54.
17. Muller EV, dos Santos DF, Corrêa NAB. Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense – Umuarama – PR Prevalence of de microorganisms in urinary tract infections of patients attended in the cli. *Rbac.* 2008;40:35–7.
18. Sfair S, Bertoldi MB, Rocha JL, Tuon FF. Fatores de risco associados à infecção do trato urinário nosocomial por betalactamases de espectro estendido. 2014;3(2):42–4.
19. Roriz-filho JS, Vilar FC, Leal CL, Pisi PCB. Inf ecção do tr a to urinário Infecção tra. 2010;43(2):118–25.
20. Hisano M. Análise comparativa dos achados clínicos e laboratoriais das infecções não complicadas do trato urinário em mulheres. (Tese Doutorado) São Paulo: Universidade Fed São Paulo. 2014.
21. Moura LB De, Fernandes MG. A Incidência de Infecções Urinárias Causadas por E . Coli. *Rev Olhar Científico – Faculdades Assoc Ariquemes.* 2010;1(2):411–26.
22. Kumar MS, Das AP. Molecular identification of multi drug resistant bacteria from urinary tract infected urine samples. *Microbial Pathogenesis.* 2016;98:37–44.
23. MISHRA MP, Rath S, Swain SS, Ghosh G, Das D, Padhy RN. In vitro antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria. *J King Saud Univ Sci.* 2017. 29(1): 84-95.
24. Delcaru C, Alexandru I, Podgoreanu P, Grosu M, Stavropoulos E, Chifiriuc M, et al. Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. *Pathogens.* 2016;5(4):65.
25. Braoios A, Turatti TF, Meredija LCS, Campos TRS, Denadai FHM. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos

- antimicrobianos. J Bras Patol Med Lab. 2009;45(6):449–56.
26. Da Costa, Anna Carolina Borges Pereira; Pereira, Crisitane Aparecida; Freire, Fernanda; Junqueira, Juliana Campos; Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn . e *Syzygium cumini* Linn . sobre cepas clínicas de *Candida albicans* , *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Rev odont UNESP. 2009;38(2):111–6.
  27. Silva GDS. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies de *Candida* de interesse médico. Camp Gd Univ Estadual da Paraíba, Trab Conclusão Curso em Farmácia. 2012.
  28. Sobrinho RA dos S. Microrganismos envolvidos em Infecções Urinárias de mulheres com idade superior a 15 anos atendidas no HC-UFG em 2009 e os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. (Dissertação) Goiania: Universidade Federal de Goiás; 2011.
  29. Carraro-Eduardo JC, Alves D da S, Hinden IE, Toledano IP, Freitas SG, Mondino PJJ, et al. Urinary tract infection and indwelling urinary catheters: prospective study in gynecological surgery with antibiotic prophylaxis. Rev Med São Paulo. 2015;133(6):517–20.
  30. Catto AJ de A, De Azeredo AM, Weidlich L. Prevalência e perfil de resistência de *Escherichia coli* em uroculturas positivas no município de Triunfo/RS. Rev AMRIGS. 2016;60(1):1–5.
  31. Zimmermann MH, Costa CC da, Gonçalves C dos S, Gaspar MD da R, Garden CRBG. Perfil epidemiológico da infecção no trato urinário. Epidemiological profile of urinary tract infection. Publ UEPG Ciencias Biol e da Saude. 2009;15(2):033–42.
  32. Souza RB, Trevisol DJ, Schuelter-Trevisol F. Bacterial sensitivity to fosfomycin in pregnant women with urinary infection. Brazilian J Infect Dis. 2015;19(3):319–23.
  33. Silva WMO da, Souza GFXT De, Vieira PB, Sanavria A. Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal em assentamentos rurais de Seropédica – RJ. Rev Bras Ciências Veterinárias. 2013;20(1):32–6.
  34. Newman, David J; Cragg, Gordon M.; Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. J Nat Prod. 2003;66(7):1022–37.
  35. Sixel, Paulo José; Pecinalli NR. Seleção de plantas para pesquisa farmacológicas. 2002; (31):70–3.
  36. Teixeira B. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I , II e III de *Lippia alba* (Mill.) N . E . Brown Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotip. 2009;1–139.
  37. Caetano RS, Souza ACR De, Feitozao LF. O Uso De Plantas Medicinais Utilizadas Por

- Frequentedores Dos Ambulatórios Santa Marcelina , Porto Velho - Ro. Rev Saúde e Pesqui. 2014;7(1):55–63.
38. Tolmacheva AA, Rogozhin EA, Deryabin DG. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants. *Acta Pharm.* 2014;64:173–86.
  39. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016;112:4–29.
  40. Heinzmann BM, Barros FMC de. Potencial Das Plantas Nativas Brasileiras Para O Desenvolvimento De Fitomedicamentos Tendo Como Exemplo Lippia Alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Saúde (Santa Maria).* 2007;33(1):43–8.
  41. Athanasiadou S, Githiori J, Kyriazakis I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal.* 2007;1(9):1392–400.
  42. Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol.* 2006;139(4):308–20.
  43. Furtado SK. Alternativas Fitoterápicas Para O Controle Da Verminose Ovina No Estado Do Paraná : Testes in Vitro E in Vivo. (Tese doutorado) Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
  44. Chagas A. Controle Da Parasitas Utilizando Estratos Vegetais. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2004;13:156–60.
  45. Al-Hussaini R, Mahasneh AM. Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules.* 2009;14(9):3425–35.
  46. De Toledo, C., Britta, E.A., Ceole, L.F., Silva, E.R., De Mello J.C.P, Filho BPD. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachac, as an extractor liquid. Vol. 133, *J Ethnopharmacol*; 2011. p. 420–5.
  47. Dos Santos KP, Motta LB, Santos DYAC, Salatino MLF, Salatino A, Ferreira MJP, et al. Antiproliferative activity of flavonoids from croton sphaerogynus baill. (Euphorbiaceae). *Biomed Res Int.* 2015;2015.
  48. Angélico EC, da Costa JGM, Galvão FFR, Santos FO, Rodrigues OG. Composição química do óleo essencial das folhas de Croton heliotropiifolius Kant (sinônimo C. rhamnifolius): resultados preliminares. *BioFar.* 2012;7:57–61.
  49. Almeida-Pereira, CS , Silva AVC, Alves, R P, Feitosa-Alcantara, RB A-B, MF, Alvares-Carvalho, SV et al. Genetic diversity of native populations of Croton tetradenius Baill . using ISSR markers. *Genet Mol Res.* 2017;16(2):1–12.
  50. Zahran HE-DM, Abou-Taleb HK, Abdelgaleil SAM. Adulticidal, larvicidal and

- biochemical properties of essential oils against *Culex pipiens* L. J Asia Pac Entomol. 2017;20(1):133–9.
51. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod. 2014;62:250–64.
  52. Probst IDS. Atividade Antibacteriana De Óleos Essenciais E Avaliação De Potencial Sinérgico. 2012;112.
  53. Lou Z, Chen J, Yu F, Wang H, Kou X, Ma C, et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. LWT - Food Sci Technol. 2017;80:371–7.
  54. Alves, Livia Araújo; Freires, Irlan de Almeida; De Castro RD. Efeito Antibacteriano De Óleos Essenciais Sobre Bactérias Formadoras Do Biofilme Dentário. Rev Bras Ciências da Saúde. 2010;14(2):57–62.
  55. Silva MTN, Ushimaru PI, Barbosa LN, Cunha MLRS, Fernandes A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Rev Bras Plantas Med. 2009;11(3):257–62.
  56. Fang F, Candy K, Melloul E, Bernigaud C, Chai L, Darmon C, et al. In vitro activity of ten essential oils against *Sarcoptes scabiei*. Parasit Vectors . 2016;9(1):594.
  57. D’Amato S, Mazzarrino G, Rossi C, Serio A, Chaves López C, Celano GV, et al. *Thymus vulgaris* (red thyme) and *Caryophyllus aromaticus* (clove) essential oils to control spoilage microorganisms in pork under modified atmosphere. Ital J Food Saf. 2016;5(3):127–30.
  58. Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, Yawe JC, Nicolero SM, Amano SU, et al. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(20):8278–83.
  59. Geraci A, Di Stefano V, Di Martino E, Schillaci D, Schicchi R. Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. Nat Prod Res 2016;31(6):653–9.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Geral**

Avaliar o potencial antibacteriano do óleo essencial de *C. tetradenius* frente a diferentes bactérias uropatogênicas de importância clínica.

### **4.2. Específicos**

Determinar o espectro de atividade dos óleos essenciais de dois genótipos de *C. tetradenius* frente à bactérias uropatogênicas;

Determinar a concentração mínima inibitória e a dose bactericida mínima dos óleos essenciais para as linhagens sensíveis;

Verificar o efeito os óleos essenciais no crescimento das bactérias uropatogênicas;

Verificar o sinergismo de óleos essenciais e antibióticos tradicionais no controle de bactérias uropatogênicas;

Verificar a citotoxicidade dos óleos essenciais em cultura de células de mamífero.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Artigo: Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Croton tetradenius* (Baill.) frente a bactérias uropatógenas e sinergismo com antibióticos**

Periódico a ser submetido: International Journal of Antimicrobial Agents.

## POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton tetradenius* (Baill.) FRENTE A BACTÉRIAS UROPATÓGENAS E ATIVIDADE SINERGÍSTICA COM ANTIBIÓTICOS

### RESUMO

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as mais frequentes infecções no ser humano, são mais comuns em mulheres e podem apresentar-se como assintomáticas ou sintomáticas. *Escherichia coli* é o principal agente etiológico das ITUs; porém, outras bactérias Gram-negativo e algumas Gram-positivo podem estar envolvidas no processo infeccioso. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano do óleo essencial de dois genótipos de *Croton tetradenius* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram determinadas a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Dose Bactericida Mínima (DBM), seguido de teste para verificar o efeito do óleo nos parâmetros de crescimento dos microrganismos. Utilizou-se o Método de *Checkboard* para avaliar o sinergismo entre os óleos essenciais e os antibióticos ciprofloxacino e meropenem frente às bactérias utilizadas. Observou-se que os óleos dos dois genótipos de *C. tetradenius* apresentaram atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*; porém, nenhum dos genótipos foi capaz de inibir *P. aeruginosa*. A CMI e a DBM para os microrganismos testados variaram entre 2,8 a 11,3mg/mL. O aumento da concentração do óleo essencial no meio de cultura resultou no aumento da fase lag e diminuição da taxa de crescimento e DO máxima atingida pelas culturas. A combinação do OE e antibióticos apresentou efeito sinérgico na maioria das combinações, sendo indiferente somente frente à *E. coli* quando combinado OE e ciprofloxacino.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, infecção urinária, produtos naturais, monoterpenos, resistência bacteriana.

### 1. Introdução

A infecção do trato urinário (ITU) é um quadro infeccioso que acomete órgãos como rins, bexiga, uretra e ureteres, sendo mais comum na parte inferior do trato urinário, do qual fazem parte a bexiga e a uretra (1). São as infecções bacterianas mais comuns no ser humano, consideradas grave problema de saúde com aproximadamente 150 milhões de casos anuais (2). As ITUs podem ter como causa diferentes microrganismos, sendo o mais comum a *Escherichia coli* (aproximadamente 90% dos casos), seguido por *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter aerogenes* (3,4).

O aumento da resistência dos microrganismos causadores de ITUs aos antibióticos usuais e os efeitos adversos associados a estes medicamentos representam um sério problema para a saúde pública e apontam para a necessidade urgente de novos medicamentos ou terapias de combinação para tratar as infecções causadas por patógenos resistentes (5). O uso de plantas como alternativa para o tratamento de diversas doenças infecciosas vem crescendo e podem pavimentar um caminho para novos fármacos, pois fornecem uma fonte ilimitada de compostos químicos diversos que apresentam múltiplos efeitos na saúde (6–10).

*Croton tetradenius* (Baill.) é uma espécie endêmica da região Nordeste do Brasil na vegetação da Caatinga (9). Espécies do gênero *Croton* são frequentemente utilizadas na



medicina popular para alívio de dores, tratamento de cânceres, distúrbios relacionados ao trato gastrointestinal, helmintíases, em processos inflamatórios e como antibiótico, entre outras (11–15).

Nos últimos anos, foi confirmado que alguns óleos essenciais (OEs) exercem atividade antimicrobiana, uma vez que são capazes de inibir o crescimento celular e inativar as células microbianas (16–19). Embora suas atividades antimicrobianas estejam bem determinadas, os mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos (20).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano do óleo essencial de dois genótipos de *C. tetradenius* frente a diferentes bactérias uropatógenas de importância clínica e verificar o sinergismo com antibióticos tradicionais. A diversidade genética das populações nativas de *C. tetradenius* foi recentemente descrita (9) e seu potencial antibacteriano ainda não foi explorado.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Cepas Bacterianas e Condições de Cultivo

Foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853. Todas as cepas foram isoladas de infecções urinárias. Culturas puras dos microrganismos foram mantidas a -20°C, sendo cultivadas em meio BHI (Brain Heart Infusion, Himedia Laboratories, Mumbai, India) a 35°C.

### 2.2. Plantas

Dois genótipos de *C. tetradenius* foram utilizados neste estudo. As plantas foram coletadas no estado de Sergipe (Brasil) e os espécimes depositados no Herbário da Universidade Federal de Sergipe-UFS (Tabela 1).

**Tabela 1:** Origem dos genótipos *C. tetradenius* utilizados neste estudo

Genótipo	Localidade	Coordenadas	Nº depósito herbário UFS
CTE101	Lagarto/SE	10°48'51.4"S; 37°36'52.4"W	37276
CTE407	Poço Redondo/SE	09°58'06.2"S; 37°51'49.0"W	37300

### 2.3. Extração e Análise do Óleo Essencial

As folhas (70 g) foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 5 dias. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger® por 180 minutos após o início da ebulição (22). Os óleos essenciais foram devidamente coletados, estocados em frascos âmbar e armazenados em freezer à -20°C.

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massas CG/EM/DIC (GCMSQP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com injeção automática AOC-20i (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme, em um fluxo constante de Hélio 5.0 com taxa de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura de injeção foi de 280°C e 1,0 µL (10 mg/mL<sup>-1</sup>) de amostra foi injetado, com uma razão de split de 1:30. A programação de temperatura do forno iniciou-se a partir de 50°C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4°C min<sup>-1</sup>, até 200°C, em seguida, a 10°C min<sup>-1</sup> até 300°C, permanecendo por 5 min.

Para o CG/EM as moléculas foram ionizadas por ionização por elétrons com energia de 70 eV. Os fragmentos analisados por um sistema quadrupolar programado para filtrar fragmentos/íons com m/z na ordem de 40 a 500 Da e detectados por um multiplicador de elétrons. O processamento de dados foi realizado com software CGMS Postrun Analysis (Labsolutions- Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O processo de ionização para o CG/DIC foi realizado pela chama proveniente dos gases hidrogênio 5.0 (30 mL min<sup>-1</sup>) e ar sintético (300 mL min<sup>-1</sup>). As espécies coletadas e a corrente elétrica gerada foi amplificada e processada. O processamento de dados foi realizado utilizando o software CG Postrun Analysis (Labsolutions- Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (23). Para o índice de retenção foi utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC9- nC18). Também foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permite a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

#### **2.4. Determinação dos valores de CMI e DBM dos agentes antimicrobianos**

A concentração mínima inibitória (CMI) dos OEs e dos antibióticos foi determinada pelo método de microdiluição seguindo as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Os óleos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e concentrações decrescentes foram adicionadas em placas de 96 poços contendo meio líquido Mueller-Hinton (MH, Fluka Analytical- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL dos microrganismos foram inoculados utilizando a escala de McFarland (24), totalizando volume final de 100 µL por poço. As placas foram incubadas por 24 h e considerou-se como concentração mínima inibitória a menor concentração do óleo que inibiu completamente o crescimento do microrganismo por 24 h.

Para determinar a dose bactericida mínima (DBM), todo o conteúdo dos poços (100 µL) onde não houve crescimento microbiano foi semeado em meio BHI sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e o número de células viáveis foi verificado por contagem em meio sólido. Foi considerada DBM a menor concentração em que não foi detectada célula viável. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.5. Efeito do óleo essencial no crescimento de bactérias uropatogênicas

Concentrações crescentes do óleo essencial em meio MH foram adicionadas em placas de 96 poços e o crescimento das culturas foi monitorado por 24 h pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm (Leitora Multidetecção Synergy H1 – BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Posteriormente, foram determinadas a velocidade específica de crescimento, a duração da fase lag e o valor máximo de DO obtido. Tratamento controle sem a adição de OE foi usado como controle positivo e o meio líquido MH sem microrganismo utilizado como controle negativo.

## 2.6. Ensaio de sinergismo - método *Checkerboard*

Para o ensaio de sinergismo, foram utilizados os antibióticos ciprofloxacino e meropenem (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A CMI dos antibióticos para os microrganismos testados foi determinada de acordo com o método de microdiluição já descrito. O ensaio sinérgico entre o óleo essencial e os antibióticos foi realizado utilizando placas de 96 poços pelo método *Checkerboard* seguindo metodologia descrita por Du et al (25).

Foram preparadas oito diluições seriadas do óleo essencial e dos antibióticos para avaliar a atividade combinatória entre os genótipos CTE101 e CTE407 com os antibióticos frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Um volume de 50 µL de cada concentração do óleo e dos antibióticos foi adicionado em cada poço, dando um volume final de 100 µL, combinando concentrações diferentes de cada um. Uma alíquota de 10 µL da suspensão bacteriana contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL foi inoculada em cada poço. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. Após esse tempo o crescimento foi verificado pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm. O procedimento foi realizado em duplicata. A CMI dos antibióticos e do óleo essencial em combinação e isolada foi determinada como descrito acima.

Para avaliação da interação entre os antibióticos e o óleo, foi determinado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) de acordo com Du et al (25), calculado pela fórmula "CIFA + CIFB = ICIF" onde "CIFA" é o CMI do medicamento A em combinação/CMI da droga A sozinha; e "CIFB" é o CMI de fármaco B em combinação/CMI do fármaco B sozinho.

Foi interpretado como indicativo de sinergismo se o valor de ICIF for  $\leq 0,5$  ou indiferente se  $>0,5$  e  $\leq 1$  e, entre 1,0 e 4,0, classificada como antagonismo (25,26).

## 2.7. Citotoxicidade dos óleos essenciais sobre cultura de células de mamíferos

A atividade de citotoxicidade será avaliada pela medida de viabilidade determinada por ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), como descrito em ISO 10993-5/2009, com modificações. Fibroblastos L929 ( $1 \times 10^5$  céls/mL) serão adicionados em placas de 96 poços e mantidos em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h. Após esse período, a cultura será tratada diferentes concentrações dos óleos essenciais (ou compostos majoritários) e novamente incubada nas condições anteriores por mais 24 horas. Em seguida será adicionado a cada poço 200 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), e incubadas por um

período de três horas. Finalizado o tempo de incubação, o MTT será aspirado e os cristais de formazan solubilizados com 200µL DMSO. A densidade óptica será mensurada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 570nm. Os ensaios serão realizados em triplicada, e os resultados serão expressos em percentual de viabilidade conforme seguinte equação: % Viabilidade = (OD<sub>570</sub> poços experimentais/OD<sub>570</sub> poços controle não tratado) x100.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização química dos óleos essenciais (OEs)

A análise da composição química dos óleos essenciais detectou 25 compostos (Tabela 2) com predominância de monoterpenos, uma classe altamente variável de moléculas encontrada em plantas e que desempenham um papel importante em defesa contra bactérias, fungos e herbívoros (28).

No genótipo CTE 101, os principais constituintes foram cânfora e *p*-cimeno, com porcentagens de 13,37 e 13,95 %, respectivamente, seguido por trans-ascaridol (8,07%) e (*E*)-pinocarveol (8,03%). No genótipo CTE 407, os compostos majoritários são: *p*-cimeno (17,55%), seguido de trans-ascaridol (14,0%), 1,8-cineol (12,12%) e cânfora (7,25%). A alta concentração de *p*-cimeno em óleos essenciais tem demonstrado atividade antifúngica e antibacteriana. O mesmo é observado para a cânfora, avaliado como promissor agente antimicrobiano e antioxidante.

Diversos autores descrevem o potencial terapêutico do 1,8-cineol para o tratamento de doenças inflamatórias, atividade antifúngica e mais recentemente com atividade anticancerígena (29–31). O trans-ascaridol também apresentou atividade biológica para o alívio da dor, atividade antifúngica e potencial antiparasitário (32,33). Assim como comprovada atividade antimicrobiana do (*E*)- pinocarveol frente a bactérias Gram-positivo (34).

Evidências científicas indicam que a atividade relativa dos OEs pode não depender exclusivamente da proporção em que os principais compostos ativos estão presentes, mas também das interações entre estes e os constituintes menores presentes nos óleos (35), sugerindo assim efeito sinérgico entre os constituintes.

**Tabela 2.** Composição química (%) e índices de retenção do óleo essencial extraído de *Croton tetradenius*, genótipos 101 e 407.

Compostos	*IRRL	CTE 101	CTE 407
α-tujeno	924	70	1,28
α-pineno	932	6,9	1,88
Campeno	946	1,53	0,77
Sabineno	969	1	1,32
β-pineno	974	0,76	1,15
Mirceno	988	1,82	4,15
α-felandreno	1002	4,16	4,51
α-terpineno	1014	0,99	6,49
<i>p</i> -cimeno	1020	13,37	17,55
Limoneno	1024	3,33	3,4

1,8- cineol	1026	7,92	12,12
$\gamma$ -terpineno	1054	2,31	6,07
Linalol	1095	1,57	1,77
(E)- pinocarveol	1135	8,03	-
Cânfora	1141	13,95	7,25
Pinocarvona	1160	5,1	-
terpinen-4-ol	1174	1,17	2,01
$\alpha$ - terpineol	1186	0,98	2,18
cis-ascaridol	1234	2,87	5,44
acetato de isobornil	1283	2,43	0,63
acetato de bornil	1287	2,97	1,21
trans-ascaridol	1307	8,07	14,00
acetato de mirtenil	1324	1,29	0,76
$\alpha$ -humuleno	1452	0,57	0,81
óxido de cariofileno	1582	0,77	0,58

\* IRRL: Índice de Retenção Relativo (Adams, 2007).

### 3.2. Atividade antimicrobiana dos óleos

Os OEs dos dois genótipos de *C. tetradenius* testados apresentaram atividade antimicrobiana tanto contra bactérias Gram-positivo quanto Gram-negativo com formação de halos com diâmetros iguais ou superiores a 9,0mm, indicando a sensibilidade bacteriana aos óleos (Tabela 3). O único microrganismo que não foi inibido por nenhum dos genótipos foi *P. aeruginosa*. Resistência de *P. aeruginosa* também foi observada frente ao OE de *Zataria multiflora* quando testadas por Mahboubi (36). Como solubilizante, foi utilizado o Dimetilsulfóxido (DMSO) com o intuito de facilitar a difusão do óleo no meio de cultura.

Estes resultados preliminares indicam que *C. tetradenius* apresenta potencial para o controle de microrganismos patogênicos relacionados a infecções do trato urinário, incluindo a *E. coli* que é a mais comum causa de infecções (37).

Estudos recentes, relataram o efeito antimicrobiano de óleos essenciais frente a bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. O OE de *Ammodaucus leucotricus* impediu o crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e revelou aumento no diâmetro da zona de inibição diante às crescentes concentrações do óleo (18). Da mesma forma, o OE de *Zataria multiflora* exibiu atividade antimicrobiana frente à *E. coli* e *S. aureus*. A razão para a melhor atividade dos óleos frente a estas bactérias pode ser explicado pelo efeito sinérgico dos compostos majoritários presentes em sua composição (36).

Sabe-se que a composição química dos OEs pode explicar sua atividade antibacteriana (38). Os monoterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais da planta e são dotados de diversos efeitos benéficos para a saúde, incluindo antimicrobianos (39).

Seu mecanismo de ação está relacionado à sua característica não-polar (lipofílica) aumentando a capacidade de causar danos na membrana citoplasmática bacteriana, podendo ser um composto letal para microrganismos, por conferir alta penetração na membrana citoplasmática, levando a uma perda de íons, à redução do potencial da membrana e a um colapso na bomba de prótons, já observado em diferentes bactérias como *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, entre outras (40–42). Isto se

correlaciona muito bem com os resultados obtidos neste trabalho, mostrando uma importante atividade antibacteriana de *C. tetradenius* frente às cepas bacterianas testadas.

### 3.3. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Dose Bactericida Mínima (DBM) do óleo essencial

Os parâmetros CMI e DBM são determinados para avaliar a eficácia antimicrobiana dos OEs. A CMI, assim como a DBM, variou de 2,8 a 11,3 mg/mL para os diferentes microrganismos. Observou-se que *E. coli* apresentou maior sensibilidade aos óleos. Na maioria dos casos, a CMI apresentou o mesmo valor da DBM, com exceção do genótipo CTE 407 para *S. aureus*, onde a DBM foi o dobro da CMI (Tabela 3).

Diferentes OEs demonstraram resultados promissores frente à cepas bacterianas. O OE de *Cymbopogon martinii* apresentou forte atividade (CMI entre 100 e 900 µg/mL) frente as cepas de *E. coli* (43), enquanto o OE de *Eucalyptus camaldulensis* apresentou atividade antimicrobiana significativa frente a *S. aureus* (CMI = 1000 µg/mL). Meng et al. (44), realizaram CMI e DBM do OE de *Juniperus rígida* contra *K. pneumoniae*, o que indicou um inibidor bacteriano efetivo com concentração de 3,125mg/mL.

O OE do genótipo CTE 407 apresentou menores valores de CMI e DBM quando comparado com o OE do genótipo CTE 101. Nossos resultados também mostram que genótipo CTE 101 apresentou ação bactericida para as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*. Ação semelhante é observada para o genótipo CTE 407, exceto para *S. aureus*, onde a atividade bactericida depende da concentração do óleo: no valor da CMI, o óleo exerceu atividade bacteriostática contra esse microrganismo, necessitando o dobro desta concentração para causar a morte de todas as células.

Estudos diversos sugerem que a maior parte da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais esteja relacionada aos terpenóides oxigenados como álcoois e cetonas, por exemplo. Além disso, alguns hidrocarbonetos também apresentam atividade antibacteriana (45). O OE de *C. tetradenius* apresentou alto conteúdo de hidrocarbonetos em sua composição química, confirmando resultados descritos na literatura. Como por exemplo, a cânfora (principal composto do CTE 101) e o *p*-cimeno (composto principal do CTE 407) que exibiram um forte efeito antimicrobiano de acordo com investigações anteriores (46,47).

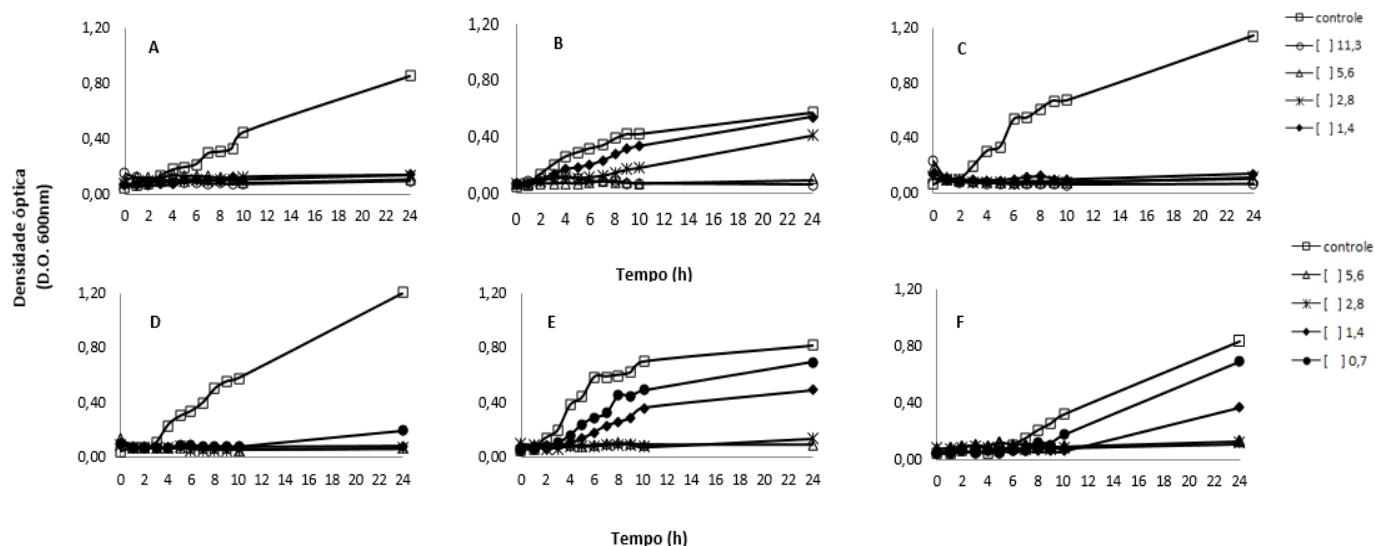
**Tabela 3:** Atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais contra *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

Genótipo	Microrganismo	CMI mg/mL	DBM mg/mL	Zona de inibição (18mg)
CTE101	<i>E. coli</i>	5,6	5,6	+
	<i>S. aureus</i>	11,3	11,3	+
	<i>K. pneumoniae</i>	11,3	11,3	+
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
CTE407	<i>E. coli</i>	2,8	2,8	+
	<i>S. aureus</i>	2,8	5,6	+
	<i>K. pneumoniae</i>	5,6	5,6	+
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-

(+) Formação de halo de inibição ≥ 9,0 mm; (-) Sem formação de halo de inibição

### 3.4. Efeito dos óleos essenciais no crescimento de bactérias uropatogênicas

Através da análise do perfil de crescimento das bactérias testadas observou-se que, maneira geral, maiores concentrações do óleo essencial resultaram no aumento da duração da fase lag, diminuição da taxa de crescimento e da densidade óptica máxima (Figura 1).



**Figura 1:** Efeito das diferentes concentrações do genótipo 101 sobre *Escherichia coli* (A), *Klebsiella pneumoniae* (B), *Staphylococcus aureus* (C); e efeito das diferentes concentrações do genótipo 407 sobre *Escherichia coli* (D), *Klebsiella pneumoniae* (E), *Staphylococcus aureus* (F).

Para o genótipo CTE 101 a menor concentrações de 1,4 mg/mL foi suficiente para inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* por mais de 24 h, quando comparado ao controle. Para *K. pneumoniae*, houve aumento de apenas 1 h na duração da fase lag na concentração de 2,8 mg/mL assim como para a concentração de 1,4mg/mL, necessitando de uma maior concentração sobre *K. pneumoniae* para aumentar a duração da fase lag e diminuir a taxa de crescimento do microrganismo (Figura 1: A, B e C).

Para o genótipo CTE 407, *E. coli* foi o microrganismo mais afetado, pois a partir da concentração de 1,4 mg/mL, não foi detectado crescimento por até 24h, detectado somente crescimento na concentração de 0,7 mg/mL no tempo 24h. Esse mesmo genótipo inibiu o crescimento de *S. aureus* por pelo menos 24 h na concentração de 2,8 mg e em concentrações menores a fase lag teve aumento de 8h. Quando o microrganismo testado foi *K. pneumoniae*, o aumento máximo observado na fase lag foi de 3 h para menor concentração de 0,7 mg/mL e para as maiores concentrações (2,8 mg/mL e 5,6 mg/mL) a duração da fase lag foi superior a 24h e diminuindo a velocidade de crescimento do microrganismo (Figura 1: D, E e F).

### 3.5. Efeito sinérgico do óleo essencial com antibióticos

A CMI dos antibióticos testados para os microrganismos utilizados variou de 0,08 a 1,3 µg/mL, sendo os menores valores observados para o antibiótico ciprofloxacino (CIP) (Tabela 4). Para o meropenem (MEM) foi necessário uma maior concentração do fármaco para inibir as linhagens testadas e o microrganismo mais sensível foi *S. aureus*. Entretanto, concentrações

de 1,3 µg/mL foram suficientes para inibir o microrganismo menos sensível, *K. pneumoniae* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos contra bactérias uropatogênicas. CMI é demonstrada em µg/mL.

Antibiótico	Microrganismo		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Ciprofloxacino	0,08±0,0005*	0,3 ±0,017	0,3±0,0005
Meropenem	0,6±0,09	0,3±0,009	1,3±0,0017

\*Os dados referem-se à média de duas réplicas ± desvio padrão.

Uma potencialização de atividade antibiótica foi revelada ao combinar os óleos essenciais com ciprofloxacino e meropenem frente às cepas testadas (Tabela 5 e 6). Somente contra *E. coli* a combinação OE + CIP mostrou indiferença e nenhuma das 12 combinações testadas mostrou antagonismo (Tabela 5). Um agente antimicrobiano natural pode atuar facilitando a infiltração da droga através de camadas externas da parede celular bacteriana ou mesmo perdendo efeitos inibitórios de proteção.

**Tabela 5:** Atividade inibitória *in vitro* dos genótipos do óleo essencial de *C. tetradenius* em associação com Ciprofloxacino e com Meropenem.

MICRORGANISMO	ÓLEO	CIF	ICIF	Observado
<i>E. coli</i> + CIP	CTE 101	0,08/0,66	0,74	Indiferente
	CTE 407	0,04/0,20	0,24	Sinergismo
<i>S. aureus</i> + CIP	CTE 101	0,42/0,05	0,47	Sinergismo
	CTE 407	0,03/0,10	0,13	Sinergismo
<i>K. pneumoniae</i> + CIP	CTE 101	0,01/0,08	0,09	Sinergismo
	CTE 407	0,01/0,17	0,18	Sinergismo
<i>E. coli</i> + MEM	CTE 101	0,16/0,04	0,20	Sinergismo
	CTE 407	0,08/0,27	0,35	Sinergismo
<i>S. aureus</i> + MEM	CTE 101	0,16/0,06	0,22	Sinergismo
	CTE 407	0,09/0,08	0,17	Sinergismo
<i>K. pneumoniae</i> + MEM	CTE 101	0,01/0,08	0,09	Sinergismo
	CTE 407	0,01/0,49	0,50	Sinergismo

CIF: CMI do OE na associação/CMI do OE isolado + CMI do CIP na associação/CMI do CIP isolado. ICIF: CMI do OE na associação/CMI do OE isolado + CMI do MEM na associação/CMI do CIP isolado. Índice CIF = CIF<sub>OE</sub> + CIF<sub>CIP</sub>. ICIF ≤0,5: sinergismo; >0,5 e ≤ 1,0: indiferente e ICIF entre 1,0 e 4,0: antagonismo (DU et al., 2015 & SEPTAMA et al., 2017).

A sinergia entre CTE 101 + CIP assim como CTE 101 + MEM demonstraram melhor ação sobre *K. pneumoniae*, enquanto o genótipo CTE 407 + CIP e CTE 407 + MEM melhor sinergia sobre *S. aureus*. Para a cepa de *E. coli* ambas as combinações foram maiores



quando testadas. Os resultados demonstraram que os genótipos CTE 101 e CTE 407 potencializaram a ação do ciprofloxacino e meropenem diante as diferentes cepas analisadas.

O uso de combinações entre antibióticos convencionais e um agente natural pode aumentar suas atividades biológicas devido à interação de cada composto. Diferentes compostos podem ter diferentes alvos influenciando na resposta terapêutica (48). Várias propriedades farmacológicas dos OE sugerem potencial para inibir bactérias patogênicas e em combinação com o antibiótico tradicional podem impedir eficientemente o crescimento de cepas em concentrações mais baixas do que as exigidas para antimicrobiano individual *in vitro* (49,50).

Nossos experimentos demonstraram que as combinações entre os antibióticos e o óleo essencial reduziram as CMI e aumentaram sinergicamente o efeito bactericida contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo.

### 3.6. Citotoxicidade do óleo essencial de *Croton tetradenius*

Em geral, os OEs apresentaram baixa citotoxicidade em fibroblastos L929. Os resultados dos testes foram expressos como porcentagem de viabilidade. Uma escala de intensidade baseada em Rodrigues et al. (51) foi usada para classificar a citotoxicidade dos compostos. A  $50\mu\text{g mL}^{-1}$ , o genótipo CTE101 foi considerado não citotóxico ( $86.7\% \pm 2.5$ ) e apresentou baixa citotoxicidade a  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $58.8\% \pm 8.4$ ). Por outro lado, o genótipo CTE407 apresentou baixa citotoxicidade a  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $73.7\% \pm 0.6$ ) e citotoxicidade moderada a  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $46.1\% \pm 1.9$ ).

## 4. Conclusões

Este estudo é pioneiro em demonstrar que o óleo essencial de *C. tetradenius* apresenta atividade antibacteriana frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Quando combinado com os antibióticos tradicionais, o óleo essencial de *C. tetradenius* apresentou efeito sinérgico contra as cepas testadas. Desta forma, podemos concluir que o óleo essencial sozinho ou em combinação com antibióticos, pode ser sugerido como um agente antibacteriano *in vitro* contra linhagens de *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Essa descoberta abre caminho para o desenvolvimento de um novo método de tratamento de infecções do trato urinário causadas por agentes patogênicos resistentes aos fármacos convencionais. Porém, novas pesquisas são necessárias para determinar mecanismos de ação e assim desenvolver um novo agente farmacológico para tratamento de bactérias resistentes a medicamentos.

## Referências

1. Schenkel DF, Dallé J, Antonello VS. Prevalência de uropatógenos e sensibilidade antimicrobiana em uroculturas de gestantes do Sul do Brasil. Rev Bras Ginecol e Obs [Internet]. 2014;36(3):102–6.
2. Adeep M, Nima T, Kezang W, Tshokey T. A retrospective analysis of the etiologic agents and antibiotic susceptibility pattern of uropathogens isolated in the Jigme Dorji

- Wangchuck National Referral Hospital, Thimphu, Bhutan. BMC Res Notes [Internet]. BioMed Central; 2016;9(1):54.
3. Kumar MS, Das AP. Molecular identification of multi drug resistant bacteria from urinary tract infected urine samples [Internet]. Vol. 98, Microbial Pathogenesis. 2016. p. 37–44.
  4. Rafsanjany N, Sendker J, Lechtenberg M, Petereit F, Scharf B HA. Traditionally used medicinal plants against uncomplicated urinary tract infections: Are unusual, flavan-4-ol- and derhamnosylmaysin.
  5. Sienkiewicz M, Łysakowska M, Kowalczyk E, Zyna G\_, Nska S, Kochan E, et al. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. J Burn. 2016;
  6. Lahmar A, Bedoui A, Mokdad-Bzeouich I, Dhaouifi Z, Kalboussi Z, Cheraif I, et al. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. Microb Pathog. 2016;1–10.
  7. Kama-Kama F, Midiwo J, Nganga J, Maina N, Schiek E, Omosa LK, et al. Selected ethno-medicinal plants from Kenya with in vitro activity against major African livestock pathogens belonging to the “Mycoplasma mycoides cluster.” J Ethnopharmacol [Internet]. Elsevier; 2016;192:524–34.
  8. Abuzeid N, Kalsum S, Koshy RJ, Larsson M, Glader M, Andersson H, et al. Antimycobacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Sudan to treat infectious diseases. J Ethnopharmacol [Internet]. 2014 Nov [cited 2017 Jul 24];157:134–9.
  9. Almeida-Pereira, CS , Silva AVC, Alves, R P, Feitosa-Alcantara, RB A-B, MF, Alvares-Carvalho, SV et al. Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill . using ISSR markers. Genet Mol Res. 2017;16(2):1–12.
  10. Bahmani M, Saki K, Shahsavari S, Rafieian-Kopaei M, Sepahvand R, Adineh A. Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2015;5(10):858–64.
  11. Vidal CS, Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins A, de Alencar Silva A, de Oliveira MRC, Ribeiro-Filho J, de Albuquerque TR, et al. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017 May [cited 2017 Jul 24];89:47–55.
  12. Gogoi S, Yadav AK. Therapeutic efficacy of the leaf extract of *Croton joufra* Roxb. against experimental cestodiasis in rats. J Parasit Dis. Springer India; 2017;41(2):417–22.
  13. De Oliveira RG, Ferraz CAA, Silva JC, De Oliveira AP, Diniz TC, E Silva MG, et al. Antinociceptive effect of the essential oil from *Croton conduplicatus* Kunth (Euphorbiaceae). Molecules. 2017;22(6).
  14. Girondi CM, De Oliveira AB, Prado JA, Koga-Ito CY, Borges AC, Botazzo Delbem AC, et al. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus spp.* Future Microbiol. 2017;12(8).

15. Meireles DRP, Fernandes HMB, Rolim TL, Batista TM, Manguiera VM, de Sousa TKG, et al. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against ehrlich ascites carcinoma cells. *Brazilian J Pharmacogn*. 2016;26(6):751–8.
16. Teymouri, Mehdi; Alizadeh A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of.
17. Szczepanik M, Walczak M, Zawitowska B, Michalska-Sionkowska M, Szumny, Antoni; Wawrzęńczyk, Czesław; Brzezinska MS. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activity against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) and *Artemisia dracunculus* L. essential oils. *J Organ Behav*. 2017;1–30.
18. Gherraf N, Zellagui A, Kabouche A, Lahouel M, Salhi R, Rhouati S. Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oils of *Ammodaucus leucotricus*. *Arab J Chem* [Internet]. King Saud University; 2017;10:2476–8.
19. D’Amato S, Mazzarrino G, Rossi C, Serio A, Chaves López C, Celano GV, et al. *Thymus vulgaris* (red thyme) and *Caryophyllus aromaticus* (clove) essential oils to control spoilage microorganisms in pork under modified atmosphere. *Ital J Food Saf* [Internet]. 2016;5(3):127–30.
20. Radaelli M, da Silva BP, Weidlich L, Hoehne L, Flach A, da Costa LAMA, et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian J Microbiol*. 2016;47(2):424–30.
21. Nergard CS, Ho TPT, Diallo D, Ballo N, Paulsen BS, Nordeng H. Attitudes and use of medicinal plants during pregnancy among women at health care centers in three regions of Mali, West-Africa. *J Ethnobiol Ethnomed* [Internet]. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*; 2015;11(1):73.
22. EHLERT PAD, BLANK AF, ARRIGONI-BLANK MF, PAULA JWA, CAMPOS DA, ALVIANO CS. COMUNICAÇÃO Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais RESUMO : Pouco se sabe a respeito do tempo de hidrodestilação necessário para se obter o máximo volume e otimizar o processo de extração do óleo esse. *Rev Bras Plantas Med*. 2006;8(2):79–80.
23. Adams RB, Ferreira D. A theory of friendly boards. *J Finance*. 2007;62(1):217–50.
24. Almeida JRGS, Araújo CS, Pessoa CDÓ, Costa MP, Pacheco AGM. Atividade Antioxidante, Citotóxica e Antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Rev Bras Frutic*. 2014;36(1):258–64.
25. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Anim Sci Biotechnol*. 2015;1–12.
26. Septama AW, Xiao J, Panichayupakaranant P. A synergistic effect of artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* L. (Moraceae) on the antibacterial activity of selected antibiotics and cell membrane permeability. *J Intercult Ethnopharmacol* [Internet]. 2017;6(2):186–91.
27. SANTOS IGDA. ATIVIDADE AMEBICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DO GÊNERO *LIPPIA* (VERNEMACEAE) FRENTE A TROFOZOITOS DE

ACANTHAMOEBA POLYPHAGA. 2014;

28. Herrmann F, Wink M. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. *Phytomedicine* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2011;18(13):1191–6.
29. Sampath S, Veeramani V, Krishnakumar GS, Sivalingam U, Madurai SL, Chellan R. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1,8-Cineole-containing n -hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017 Sep [cited 2017 Jul 24];93:296–307.
30. Ksouri S, Djebir S, Bentorki AA, Gouri A, Hadeif Y, Benakhla A. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *J Mycol Médicale / J Med Mycol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Jul 24];27(2):245–9.
31. Padalia RC, Verma RS, Chauhan A, Goswami P, Verma SK, Darokar MP. Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1,8-cineole. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Jul 24];63:264–8.
32. Blázquez MA, Carbó E. Control of *Portulaca oleracea* by boldo and lemon essential oils in different soils. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Jul 24];76:515–21.
33. Dembitsky V, Shkrob I, Hanus LO. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palack??, Olomouc, Czechoslov.* 2008;152(2):209–15.
34. Dhouioui M, Boulila A, Chaabane H, Zina MS, Casabianca H. Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (*Aristolochiaceae*) roots and its antimicrobial activity. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2016 May [cited 2017 Jul 28];83:301–6.
35. Sarrazin SLF, da Silva LA, Oliveira RB, Raposo JDA, da Silva JKR, Salimena FRG, et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids Health Dis* [Internet]. *Lipids in Health and Disease*; 2015;14(1):145.
36. Mahboubi M, Heidarytabar R, Mahdizadeh E, Hosseini H. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus* species and *Zataria multiflora* essential oils. *Agric Nat Resour* [Internet]. Elsevier; 2018 Mar 31 [cited 2018 Apr 17].
37. Lob SH, Nicolle LE, Hoban DJ, Kazmierczak KM, Badal RE, Sahm DF. Susceptibility patterns and ESBL rates of *Escherichia coli* from urinary tract infections in Canada and the United States, SMART 2010–2014. 2016;
38. Fadil M, Fikri-Benbrahim K, Rachiq S, Ihssane B, Lebrazi S, Chraibi M, et al. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium* : Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Jul 24].
39. Nikolić B, Vasiljević B, Mitić-Ćulafić D, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chem Biol Interact*

- [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Jul 24];242:263–71.
40. Alencar Filho JMT de, Araújo L da C, Oliveira AP, Guimarães AL, Pacheco AGM, Silva FS, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. 2017 Mar [cited 2017 Jul 24];
  41. Oz M, Lozon Y, Sultan A, Yang K-HS, Galadari S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2015 Aug [cited 2017 Jul 24];152:83–97.
  42. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Sarker SD, Moore JE, Rao JR, et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44(4):1199–206.
  43. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2007 May 4 [cited 2018 Feb 20];111(2):197–201.
  44. Meng X, Li D, Zhou D, Wang D, Liu Q, Fan S. Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of the essential oil from the leaves of *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc against *Klebsiella pneumoniae*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2016 Dec 24 [cited 2018 Feb 20];194:698–705.
  45. Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Jul 24];88:112–9.
  46. Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Ind Crops Prod* [Internet]. Elsevier; 2017;107(February):305–11.
  47. Bouyahya A, Et-Touys A, Bakri Y, Talbaui A, Fellah H, Abrini J, et al. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microb Pathog* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 22];111:41–9.
  48. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*. 2015;22(2):245–55.
  49. Boonyanugomol W, Kraisiwattana K, Rukseree K, Boonsam K, Narachai P. In vitro synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *J Infect Public Health* [Internet]. King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences; 2016;1–7.
  50. Torres CA, Nuñez MB, Isla MI, Castro MP, Gonzalez AM, Zampini IC. Antibacterial synergism of extracts from climbers belonging to Bignoniaceae family and commercial antibiotics against multi-resistant bacteria. *J Herb Med* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2016;8:24–30.
  51. Rodrigues FAR, Bomfim I da S, Cavalcanti BC, Pessoa C, Goncalves RSB, Wardell JL, et al. Mefloquine-Oxazolidinone Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chem Biol Drug Des* [Internet]. 2014;83(1):126–31.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, podemos elencar as seguintes conclusões:

- Os óleos essenciais de *C. tetradenius* apresentaram potencial antibacteriano contra os uropatógenos testados, tanto para bactérias Gram-negativo quanto para Gram-positivo;
- A bactéria *E. coli* foi a que apresentou maior sensibilidade ao óleo de *C. tetradenius*;
- O efeito dos OEs de *C. tetradenius* frente à *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* foi bactericida independente da concentração na maioria dos genótipos;
- O aumento da concentração dos óleos reduziu a taxa de crescimento e aumentou a fase lag dos microrganismos testados;
- O teste de *checkerboard* demonstrou sinergismo entre os óleos essenciais de *C. tetradenius* e os antibióticos ciprofloxacino e meropenem frente às cepas testadas;
- O sinergismo entre o genótipo CTE 101 e ciprofloxacino, assim como meropenem, demonstrou melhor ação sobre *K. pneumoniae*, enquanto a combinação do genótipo CTE 407 com os antibióticos apresentou melhor sinergismo frente a *S. aureus*;
- Nenhum dos óleos essenciais apresentou citotoxicidade significativa nas concentrações testadas.
- O estudo confirmou a efetividade *in vitro* do óleo essencial de *C. tetradenius* quando testado isolado ou em combinação com antibióticos frente a linhagens de *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*.